



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 17 531 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 198 17 531.0
㉑ Anmeldetag: 9. 4. 98
㉒ Offenlegungstag: 21. 10. 99

⑤ Int. Cl.⁶:
G 01 N 1/28
B 01 L 3/00
G 01 N 21/78
G 01 N 31/22
G 01 N 30/00
G 01 N 27/447
G 01 N 35/00
G 01 N 33/48
G 01 B 21/00
C 12 Q 1/00
B 41 J 2/03

BEST AVAILABLE COPY

// G01N 33/535,33/66, C12Q 1/68,C12M 1/34

⑦ Anmelder:

Institut für Diagnostikforschung GmbH an der
Freien Universität Berlin, 14050 Berlin, DE

⑦a Vertreter:

Wablat, W., Dipl.-Chem. Dr.-Ing. Dr.jur., Pat.-Anw.,
14129 Berlin

⑦2 Erfinder:

Koch, Hans, Prof. Dr., 12159 Berlin, DE; Semmler,
Wolfhard, Dr.Dr., 13467 Berlin, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:

DE	40 27 728 A1
DE	40 24 545 A1
EP	05 56 566 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren und Vorrichtung zur Anfertigung von Synthese- oder Analysereihen

⑤7 Bei einem Verfahren zur Erzeugung einer Vielzahl kleinstvolumiger unterschiedlicher Akkumulationsprodukte aus unterschiedlichen Ausgangsstoffen und in wechselnder Dosierung der Einzelkomponenten sowohl für die Synthese als auch für die Analyse der Mischprodukte hinsichtlich physikalischer und chemischer Eigenschaften werden die Akkumulationsprodukte an vorgegebenen Positionen eines flächenhaften Substrats programmgesteuert nach dem Tintenstrahldruckerprinzip aufgetragen. Dabei werden winzige Tröpfchen der in verschiedenen, einem Materialausgabekopf zugeordneten Stoffkammern gespeicherten fließfähigen Ausgangsstoffe auf der Grundlage eines Rechnerprogramms in bestimmter Dosierung an vorgegebenen Positionen auf das Substrat bzw. in entsprechende Vertiefungen in diesem gespritzt und gegebenenfalls mit einem Sensor, der einem Meßkopf zugeordnet ist, untersucht. Das Verfahren erlaubt mit geringem apparativem Aufwand sowie in kürzester Zeit und bei geringem Materialbedarf die Anfertigung exakt dosierter Akkumulationsprodukte zur Aufstellung von Synthese- und Analysereihen.

DE 198 17 531 A 1

DE 198 17 531 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anfertigung von Synthese- oder Analysereihen, bei dem kleinste veränderliche Volumina verschiedener Ausgangsstoffe zu einer Vielzahl unterschiedlicher Akkumulationsprodukte zusammengefügt und gegebenenfalls hinsichtlich bestimmter physikalischer und/oder chemischer Eigenschaften untersucht werden, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Bei der Anfertigung von Synthese- und Analysereihen und der Erstellung von Tests mit Mikrotiterplatten, kombinatorischen Bibliotheken oder DNA-Chips sowie bei der Zelldifferenzierung, bei In-vitro-Diagnostika in der Trockenchemie, der Anfertigung von Phasendiagrammen oder bei der photometrischen Untersuchung von Reaktionskinetiken wird eine Vielzahl kleinstvolumiger Stoffanhäufungen (Akkumulationsprodukte) aus einem Stoff mit unterschiedlichem Volumen oder aus Stoffgemischen oder Reaktionsprodukten mit unterschiedlicher Zusammensetzung und darüber hinaus unterschiedlichem Volumen entweder als Syntheseprodukt oder für eine nachfolgende Untersuchung erzeugt. Mit einer großen Variationsbreite durchzuführende Synthese- und Analysereihen sind jedoch sehr arbeits- und zeitaufwendig und zudem mit einem hohen und vor allem kostenintensiven apparativen Aufwand verbunden.

Beispielsweise werden bei einem bekannten Verfahren in der klinischen Laboratoriumschemie zur quantitativen und qualitativen Analyse Photometer eingesetzt. Dabei werden Proben biologischen Ursprungs, zum Beispiel Blut, mit einer Reagenz oder auch mehreren Reagenzien vermischt, die mit der in der Probe nachzuweisenden Komponente eine Reaktion eingehen. Diese Reaktion bewirkt eine spezifische Änderung der optischen Eigenschaften des Mischprodukts, die mit dem Photometer nachgewiesen und quantitativ erfaßt wird. Die Herstellung der für eine Untersuchungsreihe erforderlichen, unterschiedlich zusammengesetzten Analyseprodukte erfolgt mit Hilfe aufwendiger Pipettierautomaten, während die optische Untersuchung der einzelnen – beleuchteten – Mischprodukte mit einem Photodetektor durchgeführt wird. Zwar kann die beschriebene photometrische Untersuchung vollautomatisch vorgenommen werden, und es ist die Anfertigung und Analyse einer Vielzahl unterschiedlichster Mischprodukte möglich, jedoch sind die entsprechenden Automaten apparativ sehr aufwendig und teuer.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit dem in kürzester Zeit und mit geringem apparativem Aufwand eine Vielzahl exakt dosierter Stoffakkumulationen aus zwei oder mehreren Ausgangsstoffen in unterschiedlicher Zusammensetzung und/oder Konzentration bereitgestellt und gegebenenfalls untersucht werden kann.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe bei einem Verfahren zur Anfertigung von Synthese- und Analysereihen gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1 in der Weise gelöst, daß die Akkumulationsprodukte nach dem Tintenstrahldruckerprinzip programmgesteuert an vorgegebenen Positionen auf einem im wesentlichen flächenhaften Substrat gebildet werden, indem feinste Tröpfchen oder Strahlen der in flüssiger Form in einem üblicherweise als austauschbarer Druckkopf fungierenden, linear hin- und herbewgbaren Materialausgabekopf gespeicherten Ausgangsstoffe nach einem hinsichtlich ihrer jeweiligen Dosierung und Positionierung spezifischen Rechnerprogramm auf die Oberfläche des Substrats aufgetragen werden und die Akkumulationsprodukte bei einer Analyse anschließend von einem mit einem linear hin- und herbewgbaren Meßkopf verbundenen Sen-

sor an den programmierten Positionen untersucht werden, wobei das Substrat zeilenweise in einer zur Linearbewegung des Materialausgabekopfes bzw. des Meßkopfes senkrechten Richtung bewegt wird.

Der Grundgedanke der Erfindung liegt mit anderen Worten in der Anwendung eines an einen Rechner angeschlossenen Tintenstrahldruckers zur Erzeugung einer Vielzahl sich in ihrer stofflichen und mengenmäßigen Zusammensetzung unterscheidenden Syntheseprodukten oder Stoffmischungen bzw. Reaktionsprodukten für eine anschließende Untersuchung hinsichtlich bestimmter Eigenschaften oder Wirkungen, des Vorhandenseins von Wirkstoffen usw. Das heißt, es werden die bekannten Wirkprinzipien eines für den Farbdruk ausgebildeten Tintenstrahldruckers genutzt, die in dem programmgesteuerten Aufspritzen unterschiedlicher Stoffe und Stoffmengen auf eine Unterlage durch gesteuertes Öffnen und Schließen der jeweiligen Düsen des mit Vorratsbehältern verbundenen Materialausgabekopfes bzw. elektrostatisches oder magnetisches Ablenken der nicht gewünschten Stoffstrahlen bestehen, um Syntheseprodukte oder Akkumulationsprodukte für eine anschließend durchzuführende Analyse auf einem flächenhaft ausgebildeten Substrat zu erzeugen.

Der Materialausgabekopf kann einteilig mit mehreren Vorratsbehältern für unterschiedliche, getrennt gesteuerte Düsenkanäle ausgebildet sein, oder es können in einem Depot mehrere Materialausgabeköpfe mit jeweils einem Vorratsbehälter vorgesehen sein, wobei in diesem Fall entsprechend dem auszugebenden Material der entsprechende Materialausgabekopf aktiviert wird. Der Materialausgabekopf und der Meßkopf sind voneinander getrennt angeordnet. Es ist aber auch denkbar, beide als eine Einheit auszubilden.

Durch die Anwendung des bekannten programmgesteuerten Druckverfahrens ist es möglich, Synthese- und Analysereihen in höchster Variationsbreite bei exakter Dosierung und mit geringem apparativen Aufwand und in kürzester Zeit anzufertigen. Die Anordnung der Synthese- und Analyseprodukte erfolgt zudem auf engstem Raum und bei geringem Materialverbrauch, was insbesondere bei teuren Ausgangsstoffen mit einer erheblichen Kostensenkung verbunden ist. Die Erfindung wird bei der Anfertigung umfangreicher Synthesereihen und Analysereihen, beispielsweise ELISA-Test mit Mikrotiterplatten, bei der Erstellung von Tests mit kombinatorischen Bibliotheken oder DNA-Chips, bei der Zelldifferenzierung, bei der Durchführung von Tests im Bereich der Trockenchemie und In-vitro-Diagnostik oder bei der photometrischen Untersuchung von Reaktionskinetiken eingesetzt.

Nach einem weiteren Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens weisen sowohl die einzelnen Stoffkomponenten als auch das Substrat eine bestimmte, aufeinander abgestimmte Oberflächenspannung auf, um ein Verlaufen der Stoffe bzw. der Stoffmischung auf dem Substrat zu verhindern.

Das Substrat besteht aus einem flexiblen Material, wie beispielsweise Papier oder Plastikfolie, oder auch aus einer starren Unterlage, beispielsweise aus Glas, Kunststoff oder dgl.

In weiterer Ausbildung der Erfindung verfügt das Substrat über eine Vielzahl in geeigneter Weise, beispielsweise lithographisch, erzeugter Vertiefungen, in die die Ausgangsstoffe für das herzustellende Syntheseprodukt oder das anschließend zu untersuchende Analyseprodukt aus den verschiedenen Vorratsbehältern des Materialausgabekopfes eingespritzt werden.

Gemäß einem weiteren Erfindungsmerkmal erfolgt die Erzeugung der Akkumulationsprodukte in einer Schutzgasatmosphäre, im Vakuum oder auch unter einem bestimmten

Temperatur- und/oder Druckregime. Darüber hinaus können die Ausgangsstoffe auch selbst erwärmt werden, um sie gegebenenfalls in einen fließfähigen, leicht aus den Vorratsbehältern (Stoffkammern) des Materialausgabekopfes austragbaren Zustand zu bringen.

In Ausgestaltung der Erfindung wird das Substrat mit bestimmten Stoffen präpariert, um dadurch beispielsweise eine optische Reaktion für die Analyse auszulösen.

Weitere Merkmale, zweckmäßige Weiterbildungen und Vorteile der Erfindung sind in den nachfolgend beschriebenen Ausführungsbeispielen sowie in den Unteransprüchen angegeben.

Nachfolgend werden zur näheren Erläuterung zwei Ausführungsbeispiele der Erfindung beschrieben.

In einem ersten Ausführungsbeispiel soll eine Serumprobe auf das Vorhandensein bestimmter Bestandteile, wie Albumin, Cholesterin, Glucose u. a., untersucht werden. Beispielsweise soll das in einem Serum gegebenenfalls vorhandene Albumin mit Bromkresolgrün nachgewiesen werden. Zunächst werden die dem als Materialausgabekopf fungierenden Druckkopf eines Farbstrahl Druckers zugeordneten Stoffkammern, von denen jeweils getrennte Düsenkanäle zum Materialausgabekopf führen, mit dem Serum sowie mit unterschiedlichen Reagenzien, die in der Lage sind, bei Vermischung mit dem Serum durch eine charakteristische Farbreaktion ein bestimmtes Enzym in dem Serum nachzuweisen, gefüllt. Der auf einer Schiene hin- und herbewegbare Materialausgabekopf ist an einen Rechner angeschlossen. Seine Bewegungen zu zu vorgegebenen Analysepositionen auf einem Substrat und die Art und Menge der in den Haltephasen des Materialausgabekopfes auszugebenden Flüssigkeit, das heißt, die Freigabe der Düsenkanäle der Stoffkammern, wird durch ein im Rechner gespeichertes spezifisches Programm für das betreffende Untersuchungsverfahren gesteuert. Als Substrat dient hier eine transparente Kunststoffolie, die, wie bei einem Druckvorgang mit einem Tintenstrahl drucker – nachdem eine Zeile auf dem Substrat mit den Mischungen aus Probe und Reagenzien belegt ist – senkrecht zur Bewegungsrichtung des Materialausgabekopfes bewegt wird.

Nachdem auf diese Weise auf dem Substrat eine Vielzahl unterschiedlicher Mischungen aus Probenmaterial und einer (oder mehreren) Reagenz(en) erzeugt wurde, werden die einzelnen Mischungen auf dem Substrat, die jetzt von einer Lichtquelle beleuchtet werden, programmgesteuert von dem Meßkopf überfahren, wobei ein an diesem angebrachter Sensor Farbe und Intensität des von der beleuchteten Mischung ausgehenden Lichts mißt. Die Meßergebnisse werden an den Rechner weitergeleitet und von diesem analysiert.

Das Aufbringen der Mischungen und deren Abtasten mit dem Sensor erfolgt bei gleichzeitiger Messung des Luftdrucks, der Luftfeuchte und der Temperatur oder auch unter vorgegebenen äußeren Bedingungen, so daß die Untersuchung auch reproduzierbar ist. Es ist weiterhin denkbar, daß mit sequentieller Zufuhr mehrerer Proben zum Probekammer und unter Anwendung zwischengeschalteter Waschkänge verschiedene Serumproben auf die Substratfolie aufgetragen werden.

Gemäß dem zweiten Ausführungsbeispiel wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Synthesprodukten aus verschiedenen Aminosäuren eingesetzt. Als Substrat wird eine Quarzplatte mit einer Vielzahl durch lithographisches Ätzen ausgebildeter Vertiefungen verwendet. Auf der Grundlage einer spezifischen Software für das betreffende Syntheseexperiment werden von dem Materialausgabekopf mit seinen die verschiedenen Ausgangssubstanzen aufnehmenden Stoffkammern nacheinander die einzelnen

Vertiefungen angesteuert, um in diese nach dem Tintenstrahl druckverfahren in der vorgegebenen Reihenfolge und Dosierung die gewünschten Ausgangssubstanzen einzutragen. Aus den Ausgangsstoffen A, B, C, D und E werden in den einzelnen Vertiefungen beispielsweise die Synthesprodukte ABAACAE, EDECEE oder CCCUDE oder andere Mischungen in den verschiedensten stoffseitigen und mengenmäßigen Zusammensetzungen erzeugt.

Auch nach diesem Ausführungsbeispiel kann in kürzester Zeit eine extreme Vielfalt an kleinstvolumigen und damit materialsparend gebildeten Synthesprodukten bereitgestellt werden. Die Synthesprodukte können anschließend, gegebenenfalls unter vorheriger rechnergesteuerter Zugabe von bestimmten Reagenzien mit dem Materialausgabekopf, mit dem am Meßkopf angebrachten Sensor, beispielsweise auf der Grundlage einer charakteristischen Farbreaktion, untersucht werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Anfertigung von Synthese- oder Analyseketten, bei dem kleinste veränderliche Volumina verschiedener Ausgangsstoffe zu einer Vielzahl unterschiedlicher Akkumulationsprodukte zusammengefügt und gegebenenfalls hinsichtlich bestimmter physikalischer und/oder chemischer Eigenschaften untersucht werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Akkumulationsprodukte nach dem Tintenstrahl druckerprinzip programmgesteuert an vorgegebenen Positionen auf einem im wesentlichen flächenhaften Substrat gebildet werden, indem feinste Tröpfchen oder Flüssigkeitsstrahlen der in flüssiger Form in einem üblicherweise als austauschbarer Druckkopf fungierenden, linear hin- und herbewegbaren Materialausgabekopf gespeicherten Ausgangsstoffe nach einem hinsichtlich ihrer jeweiligen Dosierung und Positionierung spezifischen Rechnerprogramm auf die Oberfläche des Substrats aufgetragen werden und die Akkumulationsprodukte bei einer Analyse anschließend von einem mit einem linear hin- und herbewegbaren Meßkopf verbundenen Sensor an den programmierten Positionen untersucht werden, wobei das Substrat zeilenweise in einer zur Linearbewegung des Materialausgabekopfes bzw. des Meßkopfes senkrechten Richtung bewegt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat und das Akkumulationsprodukt zueinander in einem bestimmten Verhältnis ihrer Oberflächenspannungen stehen, um ein Verlaufen des Akkumulationsprodukts zu verhindern.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in das Substrat Vertiefungen zur Aufnahme der Akkumulationsprodukte eingeformt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat aus flexiblem Material, wie Papier oder Kunststoff, oder aus starrem Material, wie zum Beispiel einer Plastikplatte oder einer Quarzplatte, besteht.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Aufbringen der Ausgangsstoffe auf das Substrat in einer Schutzgasatmosphäre oder im Vakuum und/oder unter einem bestimmten zeitlichen und/oder örtlichen Temperaturverlauf durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Auftragen der Ausgangsstoffe auf das Substrat bei mindestens einem der Ausgangsstoffe der Akkumulationsprodukte eine chromatographische oder elektrophoretische Trennung

erfolgt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat zur Auslösung eines Farbumschlags des Akkumulationsproduktes zu dessen Charakterisierung und/oder qualitativer oder 5
quantitativer Analyse entsprechend präpariert ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausgangsstoffe auf ein Substrat aufgebracht werden, das ein Verlaufen (eine Diffusion) der Stoffe gestattet, wobei die an den 10
Diffusionsfronten ausgelösten Reaktionen analysiert werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zur Durchführung von Analysen Ausgangsstoffe verwendet werden, von denen 15
mindestens einer bei mindestens einem der anderen Ausgangsstoffe beim Vermischen eine Änderung der optischen Eigenschaften und/oder eine Farbreaktion auslöst, die mit dem Sensor detektiert wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß einer Probenkammer des Materialausgabekopfes sequentiell abwechselnd 20
Waschflüssigkeit und kleine Untersuchungsproben mit unterschiedlichen Eigenschaften und/oder unterschiedlicher Herkunft und/oder Charge zugeführt werden, um 25
in ein- und derselben Meßreihe eine Vielzahl unterschiedlicher Proben untersuchen zu können.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausgangsstoffe biologische Proben, wie Blut, Serum, Zellsuspensionen und 30
dgl., sind, die auf dem Substrat mit Farbsubstanzen als weiteren Ausgangsstoffen zu Akkumulationsprodukten vermischt werden, wobei eine Farbreaktion sensorisch erfaßt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß unter Verwendung mehrerer 35
Materialausgabeköpfe und Meßköpfe mit jeweils zugeordneten Vorratsbehältern bzw. Sensoren an unterschiedlichen Positionen des Substrats gleichzeitig Syntheseprodukte erzeugt oder Untersuchungen durchge- 40
führt werden.

13. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch einen Tintenstrahldrucker mit einem Materialausgabekopf mit Vorratsbehältern zur Aufnahme von Ausgangsstoffen für 45
die Analyse und Synthese sowie einen Meßkopf mit Sensoren, bei dem die mit den verschiedenen Ausgangsmaterialien in Berührung kommenden Bauteile aus gegenüber diesen Stoffen beständigen Werkstoffen 50
bestehen.

55

60

65